

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 22, 1984, pp. 357–370

## Katalytische Aktivität der Serumlipase im kontinuierlichen titrimetrischen Test in Abhängigkeit von der Temperatur

Von W. Rick und M. Hockeborn

*Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Universität Düsseldorf*

(Eingegangen am 1. September/18. Dezember 1983)

**Zusammenfassung:** Die katalytische Aktivität der Pankreaslipase im Serum wurde mit dem kontinuierlichen titrimetrischen Test zwischen 20 °C und 37 °C gemessen. Es zeigte sich mit zunehmender Temperatur eine unlineare Substrathydrolyse mit der Zeit, deren Ausmaß und erstmaliges Auftreten durch die Probe, das Serumvolumen im Test und das verwendete Triglyceridgemisch beeinflusst wird. In 27 Untersuchungsreihen ergab sich für den Temperaturbereich von 20 °C bis maximal 32 °C ein  $Q_{10}$ -Wert von 1,45 ( $s = 0,03$ ) und eine Aktivierungsenergie von  $\mu = 27,42 \pm 0,565$  kJ/mol ( $6550 \pm 135$  cal/mol;  $\bar{x} \pm s$ ).

Colipase-Zusatz bei niedrigen Meßtemperaturen bewirkte eine geringe Verschlechterung der Reaktionskinetik. In Anwesenheit des Cofaktors ist bei höheren Temperaturen ein deutlich positiver Einfluß auf die Substrathydrolyse mit der Zeit zu beobachten. Es gelang jedoch nicht, für alle Proben und Probevolumina eine Colipasekonzentration zu ermitteln, die zu einem linearen Reaktionsablauf führt.

Aus den vorliegenden Befunden geht hervor, daß für das verwendete Testverfahren eine Meßtemperatur von 25 °C beibehalten werden sollte und daß die 1969 und 1982 beschriebenen Testbedingungen unverändert gelten. Werden diese Bedingungen eingehalten, so läßt sich der Zusatz von Colipase in der zur Zeit im Handel erhältlichen Qualität experimentell nicht begründen.

### *The effect of temperature on the catalytic activity of serum lipase in the continuous titrimetric assay*

**Summary:** The catalytic activity of the pancreatic lipase in serum was measured between 20 °C and 37 °C by the continuous titrimetric assay. As the temperature was increased, the time course of substrate hydrolysis showed an increasing tendency to become non-linear. The degree of non-linearity and its time of onset depended on the sample, the volume of serum in the assay, and the composition of the triglyceride substrate mixture. Twenty seven series of investigations between 20 °C and 32 °C (maximal) showed a  $Q_{10}$  value of 1.45 ( $s = 0.03$ ) and an activation energy of  $\mu = 27.42 \pm 0.565$  kJ/mol ( $6550 \pm 135$  cal/mol;  $\bar{x} \pm s$ ).

At low assay temperature, the addition of colipase caused a slight deterioration of the reaction kinetics, whereas at higher temperatures it caused a marked improvement in the time course of substrate hydrolysis. We were unable, however, to identify a fixed colipase concentration that would promote a linear reaction irrespective of sample origin and volume.

These results show that the assay should be performed at 25 °C, and that the test conditions described in 1969 and 1982 are valid without modification. If these conditions are observed, there is no experimental basis for the addition of colipase of the quality commercially available at present.

### Einführung

Die vorliegende Arbeit wurde angeregt durch Bestrebungen in den Vereinigten Staaten, das Verfahren zur Messung der katalytischen Aktivität der Li-

pase mittels kontinuierlicher Titration der durch enzymatische Hydrolyse aus einem Triglyceridgemisch freigesetzten  $H^+$ -Ionen zu standardisieren (1), und durch die allgemeine Diskussion, bei welcher Tem-

peratur Enzymaktivitäten generell gemessen werden sollen. Systematische Untersuchungen über die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Serumlipase von der Meßtemperatur liegen bisher nicht vor. Wir prüften daher an verschiedenen Seren, die den Einsatz unterschiedlicher Serumvolumina ermöglichen, und unter Verwendung mehrerer Triglyceridgemische die Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse des Substrats durch Lipase. Außerdem untersuchten wir den Einfluß von Colipase bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.

## Material und Methoden

### Reagentien

1. Gummi arabisch, fein gepulvert, Ph Eur, Merck 4282, Charge 2579447.
2. Olivenöl verschiedener Chargen der Fa. Roth und DAB 8, Aluminiumoxid-gereinigt (2).
3. Olivenöl, Sigma 0-1500, Charge 62F01541.
4. Triolein, rein 95%, Serva 37085, 3 verschiedene Chargen. Die Herstellerangabe zur Reinheit des Präparats entspricht nicht dem tatsächlichen Trioleingehalt (3). Das unter der Bestellnummer 37086 von der Fa. Serva angebotene und zur Lipasebestimmung empfohlene „Triolein“ ist für den kontinuierlichen titrimetrischen Test ungeeignet. Dies ist aus den von der Firma übersandten Registrierungen ersichtlich (3) und wurde von uns an 3 Chargen nachgewiesen (4).
5. Triolein, über 99%, Calbiochem 6450, Chargen 103079 und 201897.
6. Glykocholsäure, Natriumsalz, Calbiochem 360512, Chargen 810044 und 210135.
7. Colipase, aus Schweinepankreas, Boehringer 644099, Chargen 1371538, 1482338, 1123238 und 1283238.
8. Natronlauge, 1 mol/l, Merck 9137.
9. Natronlauge, 0,1 mol/l, Merck 9141.
10. Salzsäure, 1 mol/l, Merck 9057.
11. Salzsäure, 0,1 mol/l, Merck 9060.
12. Bidest. Wasser, frei von Kohlendioxid.
13. Kalibrierpuffer: Präzisionspuffer Radiometer S 1500 bzw. 1510. Phosphat-Pufferlösung, pH 6,88, 0,025 mol/l, Merck 7294. Acetat-Pufferlösung, pH 4,66, 0,1 mol/l Essigsäure und 0,1 mol/l Natriumacetat, Merck 7827.
14. Stickstoff, frei von Kohlendioxid.
15. Lipoclean (Frigen), Behringwerke OSVW 60/61, Charge 254002 A.
16. Aprotinin-Lösung, 20000 KIE/ml, Trasylol, Bayer Leverkusen.
17. Human-Serumalbumin, trocken, reinst, Behringwerke ORHA 20.
18. Ammoniumsulfat zur Analyse, Merck 1217.
19. Polyethylenglycol-mono[*p*-(1,1,3,3-tetramethyl-butyl)-phenyl]-ether (Triton X-100), für die Gaschromatographie, Merck 12298.

### Lösungen

1. Gummi arabicum-Lösung, 100 g/l in bidest. Wasser. Die Herstellung entspricht den Angaben von 1969 (5), die vorhandenen Partikelchen wurden durch 10 Minuten langes Zentrifugieren bei etwa 2500 g entfernt.

2. Substratemulsion, 0,2 l/l Olivenöl bzw. Triolein in Lösung 1. Die Herstellung entspricht den Angaben von 1969 (5) unter Verwendung der unter Reagentien aufgeführten Triglyceride.
3. Na-Glykocholat-Lösung, 75 mmol/l in bidest. Wasser. 3,657 g Glykocholsäure, Natriumsalz, werden in bidest. Wasser ad 100 ml gelöst.
4. Natronlauge, 0,01 mol/l. Die Herstellung entspricht den Angaben von 1969 (5).
5. Colipase-Stammlösung, 0,5 g/l in physiologischer NaCl-Lösung.
6. Humanalbumin-Lösung, 40 g/l in physiologischer NaCl-Lösung.
7. Ammoniumsulfat-Stammlösung, 0,1 mol/l in bidest. Wasser, pH-Wert auf 8,6 eingestellt.
8. Triton X-100-Lösung, 0,1 l/l bzw. 0,01 l/l in bidest. Wasser.

### Probenmaterial

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um:

- Seren von Gesunden,
- Seren von Patienten mit akuten oder chronischen Pankreaserkrankungen,
- Sammelserum, in dem die Pankreaslipase durch zweistündige Inkubation bei 56 °C vollständig inaktiviert wurde,
- Seren, die 24 Stunden bei +4 °C gegen physiologische NaCl-Lösung dialysiert wurden,
- Seren, die nach Vorschrift des Herstellers mit Lipoclean (Frigen) behandelt wurden.

### Meßanordnung

Die Meßanordnung entsprach den Angaben von 1969 (5). Ebenso wurden von der Fa. Radiometer verwendet: pH-Meter PHM 64, Titrator TTT 80, Autobürette ABU 80, Registriergerät Servograph REC 80 mit Titrigraph-Modul REA 160 unter Benutzung der 1969 beschriebenen (5) Rührereinrichtung, Thermostatisierung, Titriergefäße, Elektroden und Bürettenspitze. Zwischen dem mit thermostatisiertem Wasser durchströmten Kupfermantel und dem Titrationsgefäß aus Glas befanden sich zur Verbesserung des Wärmeübergangs einige Milliliter bidest. Wasser, dadurch wurde im Testansatz eine Temperaturkonstanz von  $\pm 0,1$  °C erreicht. Die Meßtemperaturen betrugen 20, 22, 25, 28, 30, 32, 35 und 37 °C.

### Methodik

Prinzip, Ausführung, Auswertung und Berechnung entsprechend den Angaben von 1969 (5).

## Ergebnisse und Diskussion

Analyse von Seren bei Meßtemperaturen zwischen 20 und 37 °C ohne Zusatz von Colipase

### Reaktionsablauf bei unterschiedlichen Temperaturen

Bei der Messung der katalytischen Aktivität der Lipase in verschiedenen Seren ergibt sich unter Verwendung der genannten Triglyceride (s. Reagentien 2–5) bei Temperaturen von 20–25 °C in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge ein linearer Substratumsatz bis zu einer Reaktionszeit von 60 Minuten. Diese Linearität ist in Anwesenheit von

Glykocholat in optimaler Konzentration bei 28 °C oder darüber nicht mehr gegeben. Ein nichtlinearer Substratumsatz in Abhängigkeit von der Temperatur ist auch bei *Tietz & Repique* (6) an einem Serum bei 37 °C dargestellt. Ähnliche Befunde wurden von *Granon & Sémériva* (7) mit reiner Schweinepankreaslipase als Enzymquelle gegenüber verschiedenen Triglyceriden erhoben.

Die Ursache des nicht geradlinigen Reaktionsablaufs bei Meßtemperaturen über 28 °C konnte nicht geklärt werden. Eine Verschiebung des Optimums der Na-Glykocholatkonzentration mit zunehmender Temperatur konnte ausgeschlossen werden. Soweit in Testansätzen ein linearer Substratumsatz beobachtet wird, ist das Optimum unverändert, ebenso bleibt die Hemmwirkung durch höhere Gallensalzkonzentrationen nachweisbar (Abb. 1 und 2). Bei den Temperaturen, die bereits den genannten Effekt der nichtlinearen Substrathydrolyse bewirken, ergibt sich bei Auswertung des Laugeverbrauchs in den ersten Minuten nach Beginn der Registrierung eindeutig, daß keine Änderung im Verhalten gegenüber Glykocholat auftritt. Die so ermittelten Werte streuen zwar erheblich, lassen aber die typische Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Gallensalzkonzentration erkennen. Da eine nichtlineare

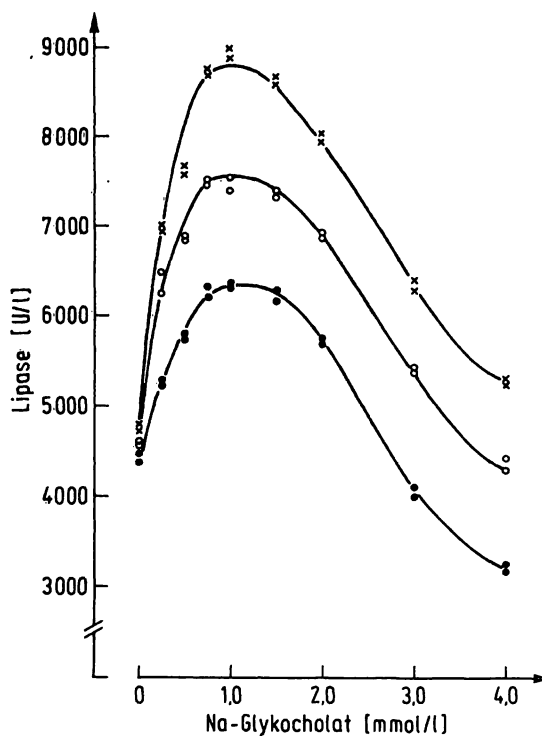


Abb. 1. Kontinuierlicher titrimetrischer Test. Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Na-Glykocholatkonzentration bei verschiedenen Reaktionstemperaturen. Triglyceridgemisch s. Reagens 4. 50 µl Serum Ba. im Test.  
●—● 20 °C  
○—○ 25 °C  
x—x 30 °C

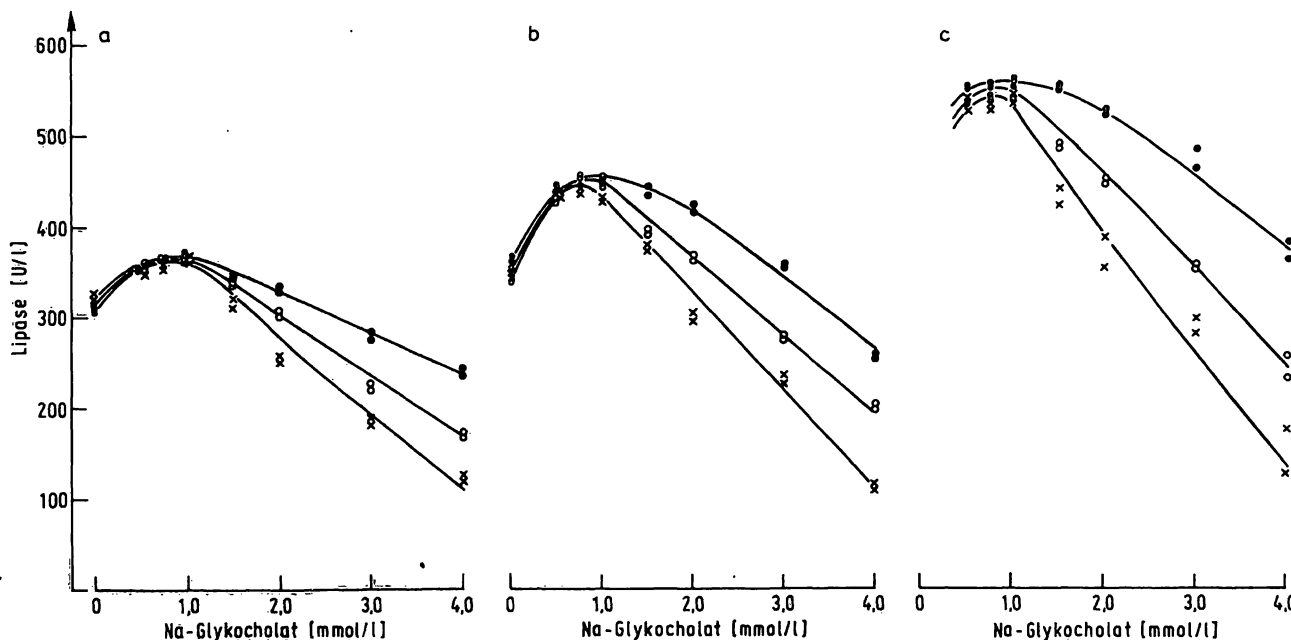


Abb. 2. Kontinuierlicher titrimetrischer Test. Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Na-Glykocholatkonzentration, dem eingesetzten Serumvolumen und der Reaktionstemperatur.

- a) 20 °C  
b) 25 °C  
c) 30 °C

(Ohne Zusatz von Na-Glykocholat lag bei 30 °C bereits eine inkonstante Hydrolysegeschwindigkeit vor.)

Triglyceridgemisch s. Reagens 2.

- 200 µl Serum Wi. im Test  
○—○ 500 µl Serum Wi. im Test  
x—x 1000 µl Serum Wi. im Test

Hydrolyse mit der Zeit im gleichen Diagramm schwer darstellbar ist, sind in Abbildung 1 und 2 die bei den Temperaturen ab 32 °C gefundenen Werte nicht eingetragen. Die von uns ermittelte temperaturunabhängige Wirkung des Gallensalzes steht im Widerspruch zu Angaben von *Fritz & Melius* (8), die Olivenöl als Substrat verwendeten, sowie von *Granon & Sémériva* (7), die Triglyceride kurz- und mittelkettiger Fettsäuren benutzten. Die Autoren fanden mit zunehmender Temperatur eine Verschiebung der optimalen Gallensalzkonzentration zu höheren Werten hin. In den genannten Arbeiten werden allerdings gereinigte Lipasepräparationen als Enzymquelle verwendet und es dienen – soweit dargestellt – außerordentlich stark unlineare Registrierungen zur Auswertung.

Auffällig war bei den Versuchen, bei denen die katalytische Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Na-Glykocholatkonzentration gemessen wurde, daß in Ansätzen ohne Gallensalz – je nach eingesetzter Probe – eine Temperaturerhöhung praktisch keinen (Abb. 1) oder nur einen geringen Effekt (Abb. 2) zeigte. Wenn in Abwesenheit von Na-Glykocholat eine Aktivitätssteigerung mit der Temperatur beobachtet wurde, ergab sich kein geradliniger Zusammenhang in der Darstellung nach *Arrhenius* (9). Auch diese Beobachtung ist ein Beispiel dafür, daß zuverlässige Aussagen über die katalytische Aktivität eines Enzyms nur möglich sind, wenn in Anwesenheit optimaler Konzentrationen aller Reaktionspartner gearbeitet wird.

Die von *Szasz* (10) diskutierte verminderte Substrataffinität von Enzymen bei höheren Temperaturen ist nicht als Ursache für die inkonstante Hydrolysegeschwindigkeit anzusehen. Wurde die Substratkonzentration dadurch variiert, daß eine Verdünnung der Emulsion mit bidest. Wasser erfolgte, so ergab sich (bei 37 °C gemessen) in Ansätzen mit reduziertem Triglyceridgehalt eine noch wesentlich schlechtere Kinetik. Bei Auftragung der zuerst registrierten Werte nach *Hofstee* (11) fand sich kein geradliniger

Zusammenhang zwischen  $v$  und  $\frac{v}{[S]}$ . Wurde die Substratemulsion mit Gummi arabicum-Lösung verdünnt, so zeigten alle Ansätze eine etwa gleich stark ausgeprägte nichtlineare Substrathydrolyse mit der Zeit. Unter vergleichbarer Auswertung ergab sich kein Anhalt für eine gegenüber 25 °C veränderte Substrataffinität. Da auch die Substratkonzentration im Test sehr hoch ist – sie beträgt das 40fache der  $K_m$  (unabhängig davon, ob als Konzentration oder als Oberfläche angegeben) – ergäbe sich auch bei einer herabgesetzten Substrataffinität keine Erklärung für die beobachtete unlineare und verminderte

katalytische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Versuchsergebnisse lassen andererseits auch den Schluß zu, daß Gummi arabicum bei erhöhten Temperaturen keine Hemmwirkung auf die Substrathydrolyse ausübt und daß die in den wäßrigen Substratverdünnungen reduzierte Calciumkonzentration keine Verbesserung der Kinetik zur Folge hat.

Weiterhin inkubierten wir Substratemulsionen 24 Stunden lang bei 25 °C bzw. 37 °C. Untersuchungen der Tröpfchengrößenverteilung mit dem Thrombocytenkanal des Coulter Counter Model S Plus ergaben keinen Hinweis für eine Änderung dieser Kenngröße in Abhängigkeit von der Temperatur. In beiden Fällen fand sich das Maximum der Tröpfchenvolumina bei 2,5 fl. Allerdings ist bei diesem Vorgehen zu berücksichtigen, daß im Meßgerät eine hohe Verdünnung des Substrats mit einer nicht zu temperierenden Verdünnungslösung erfolgt. Ebenso ergab die mikroskopische Betrachtung der Substratemulsionen keine Unterschiede. *Granon & Sémériva* (7) fanden mit Tributyrin als Substrat keine wesentliche Änderung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Temperatur. Aufgrund dieser am Substrat gewonnenen Ergebnisse ist aber nicht auszuschließen, daß höhere Temperaturen Veränderungen an der Grenzfläche zwischen Triglyceridtröpfchen und wäßriger Phase bewirken.

Wurden Proben 24 Stunden bei +4 °C gegen physiologische NaCl-Lösung dialysiert, zeigte sich keine Änderung der Kinetik bei den verschiedenen Reaktionstemperaturen. Somit ist eine temperaturabhängige Hemmung der enzymatischen Reaktion durch dialysierbare Hemmstoffe ausgeschlossen.

Ein direkter Temperatureffekt auf das Enzymmolekül im Serum ist nicht nachweisbar; auch 12 Stunden bei 37 °C inkubierte Proben zeigten bei einer Meßtemperatur von 25 °C innerhalb der Fehlerbreite eine unveränderte katalytische Aktivität.

*Borgström* (12) diskutiert eine irreversible Inaktivierung von Lipase mit zunehmender Temperatur an der Grenzfläche zwischen dem wasserunlöslichen Substrat und der wäßrigen Phase. Hinweise auf einen solchen Mechanismus ergeben sich auch aus unseren Versuchen. Kühlt man einen bei 37 °C registrierten Testansatz, der eine kontinuierliche Abnahme des Substratumsatzes erkennen läßt, schnell auf 25 °C ab und titriert weiter, so zeigt sich bei der verminderten Meßtemperatur zwar wieder eine konstante Umsatzgeschwindigkeit, jedoch wird die in Ansätzen ohne thermische Vorbehandlung bei 25 °C gemessene Aktivität nicht erreicht.

### Einfluß von Probe, Na-Glykocholat und Triglyceridgemisch auf die Substrathydrolyse bei unterschiedlichen Temperaturen

Je höher das Serumvolumen im Test ist, desto niedriger liegt die Temperatur, bei der erstmals eine inkonstante Hydrolysegeschwindigkeit beobachtet wird. Der temperaturabhängige unlineare Reaktionsablauf ist aber nicht nur an das eingesetzte Probevolumen gebunden, sondern hängt auch von der verwendeten Probe selbst ab (Tab. 1). Andererseits ist zu beobachten, daß das *Ausmaß* des nichtlinearen Substratumsatzes mit der Zeit um so größer ist, je geringer das Serumvolumen im Test ist (Abb. 3a und b).

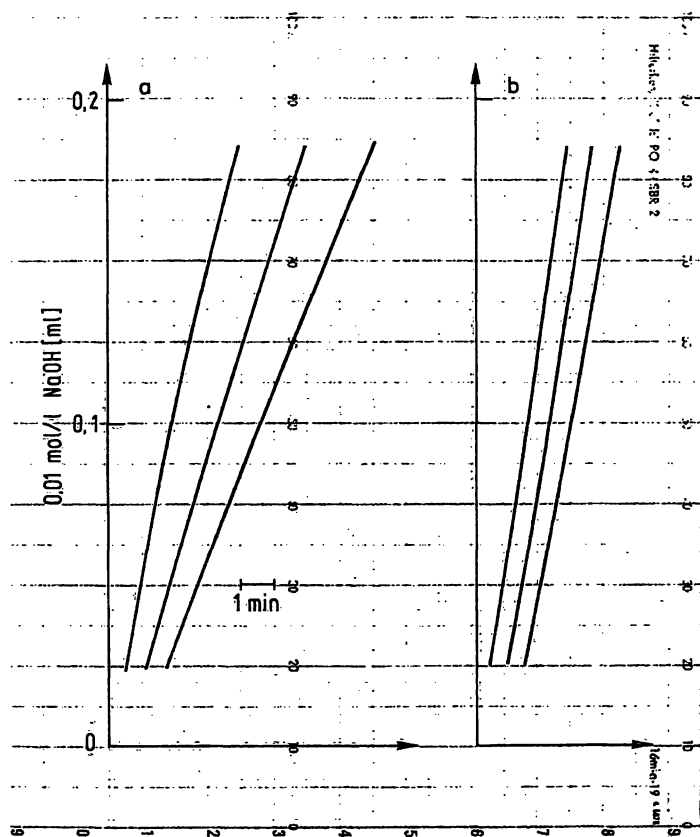


Abb. 3. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.

Einfluß des Serumvolumens im Test auf die Reaktionskinetik bei 37 °C.

a) 50 µl Serum Ba. im Test.

Bei Auswertung des anfänglich registrierten Laugeverbrauchs ermittelte katalytische Aktivitäten: 11000, 7020, 5200 U/l.

b) 50 µl Serum Ba. + 0,95 ml inaktiviertes Sammels Serum im Test

Ermittelte katalytische Aktivitäten: 13900, 12800, 11000 U/l.

Triglyceridgemisch s. Reagens 3.

Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.

Ohne Zusatz von Colipase.

Es wurde jeweils ein Testansatz über einen längeren Zeitraum titriert.

Tab. 1. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.

Temperaturen, bis zu denen in Abhängigkeit von der Probe und dem eingesetzten Volumen der gleichen Probe ein linearer Substratumsatz mit der Zeit vorliegt.

Triglyceridgemisch s. Reagens 4.

Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.

Serum	Serumvolumen/Test (µl)	Temperatur, bis zu der linearer Substratumsatz vorliegt (°C)
Ba.	20	32
	50	30
	100	28
Wi.	200	32
	500	30
	1000	28
Gr.	20	32
	50	32
	100	30
Ma.	500	32
	1000	28
B.	50	30
	100	30
Ke.	100	30
	200	28
Ho.	500	30
	1000	28
Se.	500	28
	1000	25

In welcher Weise das einzelne Serum die Hydrolyse beeinflusst, ist unklar. Eine ähnliche individuelle Wirkung der Probe auf den Substratumsatz ist auch bei Variation der Glykocholatkonzentration nachweisbar (5, 13). Hier sind ebenso Serum und Serumvolumen für den Zeitpunkt und den Umfang der Hemmwirkung durch das Gallensalz von Bedeutung, ohne daß hierfür eine Erklärung gefunden werden konnte.

Als Ursache der „besseren“ Kinetik in Gegenwart größerer Serumvolumina bei höheren Meßtemperaturen (z. B. 37 °C) ist vor allem die Anwesenheit von Albumin zu diskutieren. Brockerhoff (14) konnte zeigen, daß die nichtlineare Umsatzrate bei 37 °C von – allerdings grobdispers – Tributyrin durch reine Lipase in Anwesenheit von Rinderserumalbumin in eine Reaktion nullter Ordnung überging. Auch Borgström et al. (15) beschreiben die stabilisierende Wirkung von Serumalbumin auf Pankreaslipase.

Na-Glykocholat zeigt einen günstigen Einfluß auf den Reaktionsablauf. In Ansätzen ohne Gallensalz tritt die beschriebene inkonstante Hydrolyse bei niedrigeren Temperaturen auf als wenn Na-Glykocholat zugesetzt wird (z.B. ersichtlich aus Abb. 2c). Zusatz des Aktivators in Konzentrationen, die bereits eine Hemmung der katalytischen Aktivität bewirken, führt bei Ansätzen mit sehr geringen Probevolumina (z.B. 50 µl/Test) zu einer Verbesserung der Kinetik, nicht aber zu völlig linearen Substratumsätzen. Ein derartiger Effekt von Na-Glykocholat auf die Linearität ist bei der Analyse von Seren, die den Einsatz hoher Probevolumina (0,5–1,0 ml) ermöglichen und bei denen die inkonstante Hydrolysegeschwindigkeit ohnehin nicht so stark ausgeprägt ist, nicht nachweisbar.

Wie das Gallensalz bei höheren Reaktionstemperaturen die Triglyceridspaltung beeinflusst, ist nicht bekannt. Eine linearisierende Wirkung durch sehr niedrige Konzentrationen von Na-Glykocholat ist auch bei 25 °C in Ansätzen mit geringen Proteinmengen (z.B. verdünnter Duodenalsaft, gereinigte Lipasepräparationen) zu beobachten (13).

Vergleichsuntersuchungen an verschiedenen Ölen zeigen, daß die Temperatur, bei der erstmals eine nichtlineare Substrathydrolyse beobachtet wird, auch vom verwendeten Triglyceridgemisch abhängig ist. Ebenso wie der Beginn wird auch das Ausmaß des nichtlinearen Substratumsatzes durch das verwendete Öl mitbestimmt.

Welche Faktoren in den Triglyceridpräparationen die temperaturabhängige inkonstante Hydrolysegeschwindigkeit beeinflussen, ist nicht bekannt. Sicher ist bisher nur, daß die beschriebenen Effekte nicht mit dem Triolein-Gehalt des Öls zusammenhängen.

#### Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Meßtemperatur

Weiterhin prüften wir bei verschiedenen Temperaturen die Hydrolyse des Substrats in Abhängigkeit vom eingesetzten Probevolumen. In dem Bereich, in dem eine geradlinige Beziehung zwischen Substratumsatz und Zeit beobachtet wird, besteht bei den gewählten Temperaturen eine Proportionalität zwischen eingesetzter Serummenge und Laugeverbrauch pro Minute (Abb. 4). Sobald ein nichtlinearer Reaktionsablauf auftritt, ist keine korrekte Auswertung der registrierten Kurven möglich und somit auch keine zuverlässige Aussage über die direkte Abhängigkeit der gemessenen katalytischen Aktivität vom eingesetzten Probevolumen.

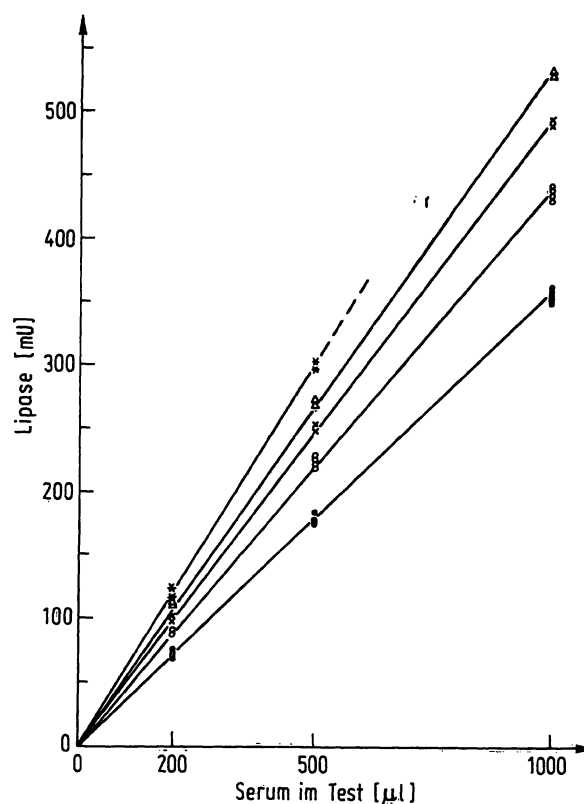


Abb. 4. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.  
Ergebnisse der Analyse unterschiedlicher Probevolumina bei Temperaturen, die einen linearen Substratumsatz mit der Zeit gewährleisten.  
Triglyceridgemisch s. Reagens 4.  
Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.  
Ohne Zusatz von Colipase.  
200, 500 und 1000 µl Serum Wi. im Test.  
●—● 20 °C  
○—○ 25 °C  
x—x 28 °C  
△—△ 30 °C  
★—★ 32 °C

Werden die Ergebnisse aus Mehrfachbestimmungen, bei denen in Anwesenheit optimaler Na-Glykocholatkonzentrationen ein linearer Substratumsatz mit der Zeit vorliegt, in Abhängigkeit von der Temperatur nach Arrhenius (9) aufgetragen, so zeigt sich eine geradlinige Beziehung (Abb. 5). Der  $Q_{10}$ -Wert – ermittelt zwischen 20 bis maximal 32 °C –, der aus 27 Untersuchungsserien errechnet wurde (z.T. wurden Verdünnungen der gleichen Probe analysiert), beträgt 1,45 mit einer Standardabweichung von 0,03. Der gefundene  $Q_{10}$ -Wert liegt in dem Bereich, der auch für andere Hydrolasen beschrieben wurde (16). Die Aktivierungsenergie ergibt sich zu  $\mu = 27,42 \pm 0,565$  kJ/mol ( $6550 \pm 135$  cal/mol;  $\bar{x} \pm s$ ); dies entspricht etwa dem von Sarda & Desnuelle (17) an Schweinepankreaslipase in Gegenwart von Taurocholat gefundenen Wert ( $\mu = 21,935$  kJ/mol = 5240 cal/mol) und den Angaben von Sizer & Josephson (18) für die Hydrolyse von Tributyrin durch Schweinepankreaslipase oberhalb von 0 °C ( $\mu = 31,82$  kJ/mol = 7600 cal/mol).

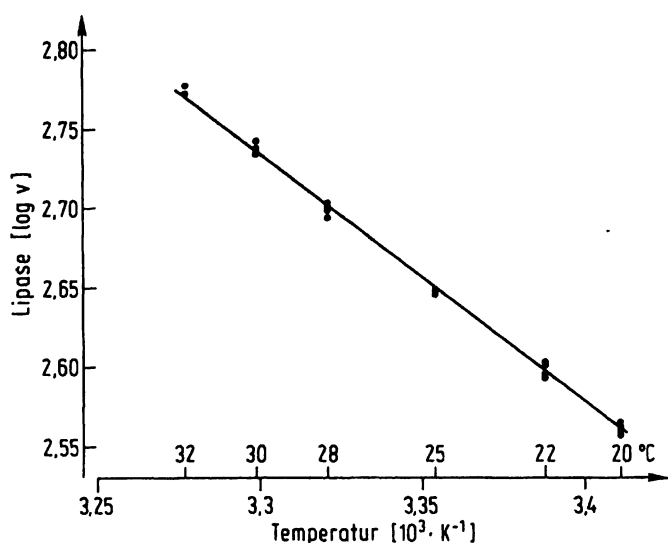


Abb. 5. Kontinuierlicher titrimetrischer Test. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur, Auswertung nach Arrhenius (9).  $Q_{10}$ -Wert (ohne Zusatz von Colipase) = 1,49 Triglyceridgemisch s. Reagens 4. Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test. 500  $\mu$ l Serum Co. im Test.

Werden die bei hohen Meßtemperaturen aus nichtlinearen Reaktionsabläufen errechneten Ergebnisse nach Arrhenius (9) dargestellt, so wird auch bei Berücksichtigung des anfänglich registrierten Laugeverbrauchs eine zunehmende Abweichung von der theoretisch zu erwartenden katalytischen Aktivität gefunden (zu ersehen aus Abb. 10). Da beim kontinuierlichen titrimetrischen Test die Aktivitätsmessung nicht unmittelbar nach Start der Reaktion möglich ist (s. unten) und steigende Temperaturen eine zunehmende „Verschlechterung“ der Kinetik bewirken, muß im Falle der Lipase angenommen werden, daß die sich ergebende Abweichung in der Auftragung nach Arrhenius (9) ausschließlich auf der bereits diskutierten zunehmenden Inaktivierung des Enzyms durch steigende Temperaturen an der Phasengrenzfläche vor Beginn der Registrierung des Laugeverbrauchs beruht. Bergmeyer (19) macht für die Abweichung von der Geraden nach Arrhenius (9), wie sie an zahlreichen Enzymen zu beobachten ist (10), eine Änderung der wirksamen Enzymkonzentration durch die Temperaturerhöhung verantwortlich. Eine „Verschlechterung“ der Kinetik muß damit jedoch nicht verbunden sein.

Analyse von Seren bei Meßtemperaturen zwischen 20 und 37 °C mit Zusatz von Colipase

Zur Prüfung der Frage, welchen Einfluß Colipase auf den Reaktionsablauf bei verschiedenen Tempe-

raturen hat, setzten wir den Cofaktor in unterschiedlichen Konzentrationen (molares Verhältnis Colipase:Lipase = 1:1 bis 10000:1) in den Test ein.

#### Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch Colipase bei niedrigen Temperaturen

Im Bereich derjenigen Meßtemperaturen, bei denen in Ansätzen ohne Colipase ein geradliniger Substratumsatz nachweisbar ist, führt der Zusatz dieses Proteins zu einer „Verschlechterung“ der Kinetik (Abb. 6). Dieser Effekt ist in Ansätzen mit großen Volumina mäßig aktiver Seren deutlicher als bei Einsatz kleiner Volumina hochaktiver Proben. Ein hoher Colipaseüberschuß führt zu stärkeren Abweichungen von der Linearität. Schließlich zeigt auch das verwendete Triglyceridgemisch einen Einfluß auf die Kinetik in Gegenwart des Cofaktors.

Wie bereits 1982 beschrieben (13), ist bei der Analyse unterschiedlicher Proben und Serumvolumina eine exakte Standardisierung des Registrierbeginns nicht möglich. Dies beruht darauf, daß der pH-Wert der Probe von Serum zu Serum schwankt, daß je nach eingesetztem Volumen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Änderung der  $H^+$ -Konzentration des Gesamtansatzes erfolgt, die evtl. eine Zugabe kleiner Mengen verdünnter Lauge oder Säure (z.B. 0,1 mol/l) erfordert, und daß die katalytischen Aktivitäten der Proben sehr unterschiedlich sein können. Während bei linearem Reaktionsablauf eine reproduzierbare Auswertung der Registrierungen über einen langen Zeitraum möglich ist, ergibt sich bei der Bewertung von Ansätzen mit inkonstanter Hydrolysegeschwindigkeit – je nachdem, zu welchem Zeitpunkt mit der Aufzeichnung des Laugeverbrauchs begonnen werden kann – zwangsläufig eine geringe Präzision. So zeigen die an Ansätzen mit Colipase aus dem zunächst registrierten Natronlaugeverbrauch ermittelten katalytischen Aktivitäten je nach verwendetem Serum und eingesetzter Colipasekonzentration eine mehr oder weniger große Streuung um die ohne den Cofaktor gefundenen Werte (z.B. zu ersehen aus Abb. 10).

Fügt man den Cofaktor zu laufenden Ansätzen zu, so zeigt sich die gleiche „Verschlechterung“ der Reaktionskinetik wie bei Zugabe vor Beginn der Titration.

Wird Serum mit Colipase bei 25 °C vorinkubiert und die Mischung zur Substratemulsion mit Na-Glykocholat zugesetzt, so ist keine bessere Linearität zu beobachten.

Infolge der inkonstanten Hydrolysegeschwindigkeit bei Zusatz von Colipase kann der Zusammenhang

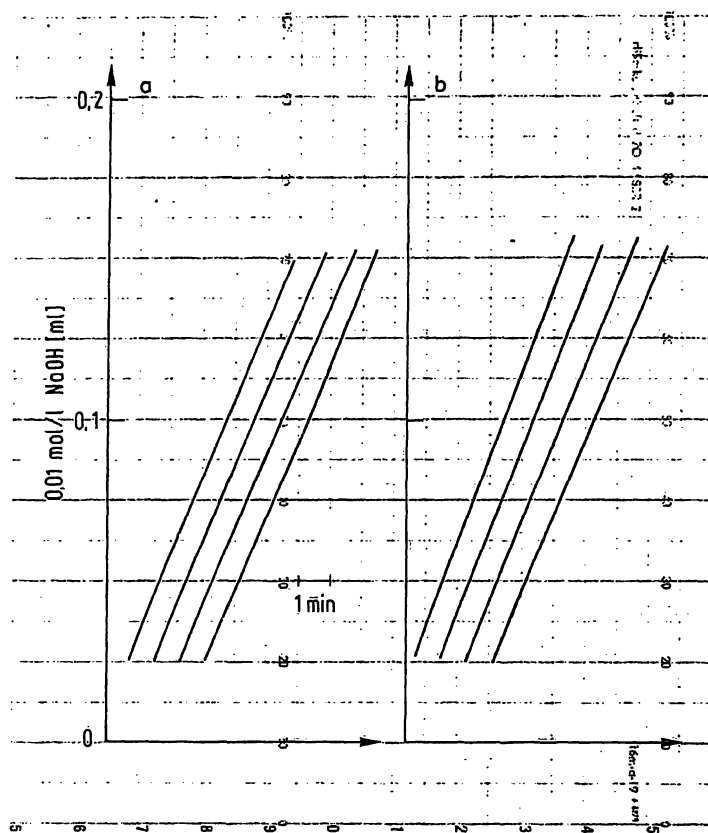


Abb. 6. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.

Einfluß von Colipase auf die Reaktionskinetik bei einer Meßtemperatur von 25 °C.

a) ohne Colipase im Test

Ermittelte katalytische Aktivitäten: 2380, 2360, 2350, 2370 U/l.

b) 333 µg/l Colipase im Test

Ermittelte katalytische Aktivitäten: 2650, 2540, 2420, 2340 U/l.

Triglyceridgemisch s. Reagens 2.

Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.

100 µl Serum B. im Test.

Es wurde jeweils ein Testansatz über einen längeren Zeitraum titriert.

zwischen eingesetztem Probevolumen und Meßsignal bei verschiedenen Temperaturen nicht ausreichend exakt beurteilt werden.

Die beschriebene Verschlechterung der Reaktionskinetik in Anwesenheit von Colipase bei den Meßtemperaturen, die in Abwesenheit des Proteins eine lineare Substrathydrolyse erkennen lassen, ist wahrscheinlich nicht auf einen einzigen Mechanismus zurückzuführen. Die Präparation der Colipase umfaßt u. a. auch eine Fällung mit Ammoniumsulfat (20, 21, 22). In den verwendeten Chargen des Cofaktors ermittelten wir mit der Glutamatdehydrogenase-Reaktion (23) geringe – wenn auch unterschiedliche – Konzentrationen an  $\text{NH}_4^+$ -Ionen. Wird Ammoniumsulfat in entsprechender Menge zu Titrationsansätzen zugesetzt, so ist eine vergleichbare Verschlechterung der Reaktionskinetik feststellbar. Eine Erhöhung der  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration führt zu einer zunehmenden Unlinearität. Dies entspricht Beobachtungen, daß die Verwendung großer Volumina Colipase den beschriebenen Effekt der inkonstanten Hydro-

lyse verstärkt und daß bei verschiedenen Chargen Colipase das Ausmaß der Unlinearität schwankt. Fügt man Testansätzen höhere Konzentrationen Ammoniumsulfat zu (Endkonzentration 0,33–3,3 mmol/l), wird neben der deutlichen Zunahme der Unlinearität ein proportionaler Anstieg des Laugeverbrauchs beobachtet. In Leerwerten ohne bzw. mit Zusatz von inaktiviertem Sammelserum und auch in Abwesenheit von Substrat wird nach Zugabe der genannten Mengen Ammoniumsulfat durch die Freisetzung von Ammoniak bei pH 8,6 ein etwa gleichgroßer konzentrationsabhängiger Verbrauch an Titrationsflüssigkeit beobachtet. Dieser Laugeverbrauch verläuft jedoch im Gegensatz zu den Probehaltigen Ansätzen linear. Die auftretende Unlinearität in Gegenwart von Ammoniumionen ist an die Anwesenheit aktiver Lipase gebunden. Wie die Kinetik beeinflusst wird, ist unklar. Es muß eine direkte Wirkung auf die enzymatische Reaktion angenommen werden, wobei auch die Eigenschaften des verwendeten Substrats für das Ausmaß der Unlinearität von Bedeutung sind.



Das verwendete Colipasepräparat enthält nach Angaben des Herstellers noch Proteasen. Mit Tosyl-L-arginin-methylester (TAME) als Substrat (24) bestimmten wir an einer Charge die Trypsinaktivität; sie entsprach 4,2 µg aktivem Trypsin pro mg Lyophilisat. Um den Einfluß der Protease auszuschalten, versetzten wir Colipaselösung mit einem ausreichend hohen Überschuß Aprotinin, so daß kein aktives Trypsin mehr nachweisbar war. Prüften wir diese Mischung im kontinuierlichen titrimetrischen Test, so ergab sich kein Unterschied gegenüber der Verwendung von Colipase ohne Aprotinin-Zusatz.

Die oben bereits beschriebenen Versuche bezüglich der Tröpfchengrößenverteilung in der Emulsion wurden auch in Gegenwart von Colipase ausgeführt, ergaben jedoch keine wesentlichen Veränderungen gegenüber den erwähnten Resultaten und somit keine Erklärung für die Unlinearität.

Ebenso konnte eine Reaktion mit im Serum enthaltenen Substraten ursächlich ausgeschlossen werden. Dialysiert man Seren 24 Stunden bei +4 °C gegen physiologische NaCl-Lösung, so ergibt sich keine Änderung bezüglich der Kinetik in An- oder Abwesenheit des Cofaktors. Eine Extraktion der Seren mit Lipoclean (Frigen) bewirkte keine Linearisierung des Reaktionsablaufs in Gegenwart von Colipase.

Da bei der Darstellung von Colipase nach *Canioni et al.* (22) Triton X-100 verwendet wird, prüften wir dessen Einfluß auf das Testsystem. In Gegenwart von 0,4 mmol/l des Detergens wird bereits eine deutliche Hemmung der Lipase beobachtet, die Linearität jedoch nicht beeinträchtigt.

Die Anwesenheit von Colipase macht es möglich, dem Ansatz Na-Glykocholat in höheren Konzentrationen zuzusetzen (Übersicht bei l.c. (15; 13)). Auch dies bewirkte jedoch keine grundlegende Verbesserung des Reaktionsablaufs.

In früheren Untersuchungen (13) wurde der beschriebene Einfluß auf die Kinetik nicht beobachtet. Der Grund hierfür kann in dem verwendeten Colipasepräparat zu suchen sein. Aus Schweinepankreas sind mehrere verschieden große Proteine mit Colipaseaktivität dargestellt worden (20), im Pankreassekret findet sich eine Vorstufe (Pro-Colipase) (25). Die reproduzierbare Isolierung eines Colipasepräparats mit definierter Aktivität ist offenbar nicht unproblematisch (15, 25). So ist eine unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Colipase-Chargen denkbar. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß das früher verwendete Triglyceridgemisch eine wesentliche Rolle spielte.

Ein weiteres ungelöstes Problem stellt der durch die Colipaselösung bedingte Laugeverbrauch gegenüber der Substratemulsion in Abwesenheit von Serumlipase dar. Versetzt man Leerwerte ohne bzw. mit inaktiviertem Sammelserum, dialysiertem inaktiviertem Sammelserum oder Humanalbuminlösung (40 g/l) mit dem Cofaktor oder einem Colipase-Aprotinin-Gemisch, so ergibt sich ein linearer Natronlaugeverbrauch (Abb. 7). Dieser Verbrauch ist von der eingesetzten Menge Colipase abhängig, zwischen 100 und 500 µg Colipase im Test ergab sich jedoch keine direkte Proportionalität zwischen eingesetzter Menge Cofaktor und Verbrauch an Titrationsflüssigkeit. Die titrierte Menge Natronlauge ist auch von der Charge der verwendeten Colipase abhängig. Größenordnungsmäßig täuschen 500 µg des Cofaktors eine Lipaseaktivität von etwa 120 mU (25 °C) vor. Setzt man Gummi arabicum-Lösung ohne Triglycerid ein und mißt die Leerreaktion in Gegenwart von Colipase, so ist der Laugeverbrauch sehr stark reduziert und nicht sicher von Null zu unterscheiden.

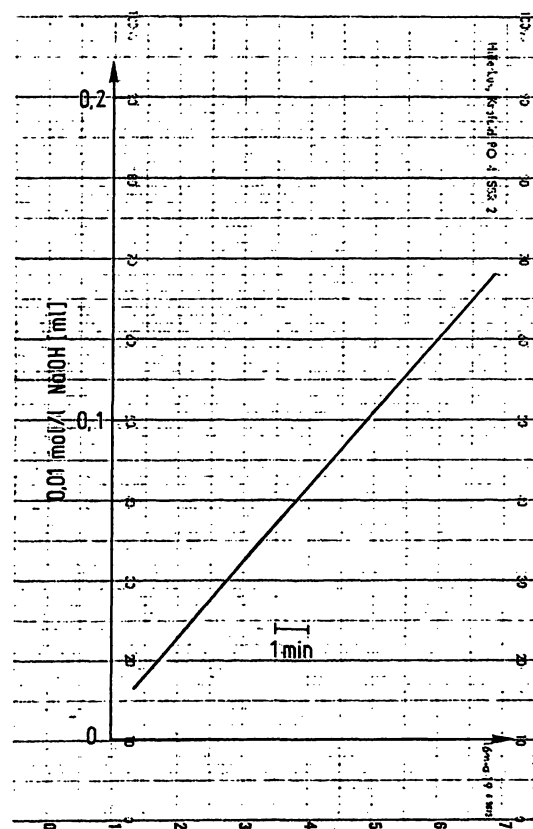


Abb. 7. Kontinuierlicher titrimetrischer Test. Laugeverbrauch bei Einsatz von 500 µg Colipase (Charge 1123238) in einen Testansatz mit 1,0 ml inaktiviertem Sammelserum und optimaler Na-Glykocholatkonzentration. Triglyceridgemisch s. Reagens 5. Meßtemperatur 25 °C.

Das Vorhandensein des Ammoniumsalzes im Präparat erklärt diesen Leerwert nicht. Die in dem Cofaktor enthaltene Menge  $\text{NH}_4^+$ -Ionen reicht für diesen Effekt nicht aus, außerdem ist der durch Ammoniumionen bedingte NaOH-Verbrauch nicht an die Anwesenheit von Substrat gebunden.

Wird Colipaselösung 2 Stunden bei  $+56^\circ\text{C}$  gehalten, ist der Verbrauch an Titrationsflüssigkeit sehr stark reduziert; daraus ist zu schließen, daß der Leerwert zum überwiegenden Teil durch eine enzymatische Reaktion verursacht sein dürfte. Die erwähnte thermische Behandlung reicht aus, um die Lipaseaktivität in einer Serumprobe vollständig zu hemmen. Colipasepräparate, die ohne ausreichende Hitzeinaktivierung hergestellt wurden, können mit Lipase verunreinigt sein. Da keine Untersuchungen über die Inaktivierung von Schweinepankreaslipase in Gegenwart hoher Colipasekonzentrationen vorliegen, ist es denkbar, daß die im Colipasepräparat enthaltene Lipase nicht vollständig denaturiert ist. *Lairon et al.* (26) beschreiben eine Inaktivierung ihrer Colipasepräparation in Anwesenheit von Trypsin bereits bei  $37^\circ\text{C}$ . Inkubierten wir ein Colipase-Aprotinin-Gemisch 2 Stunden bei  $56^\circ\text{C}$ , so stellten wir keinen Unterschied in der Restaktivität im Vergleich zu einer Inaktivierung des Cofaktors in Abwesenheit des Proteasen-Hemmstoffs fest. Der Leerwert kann auch die Resultante mehrerer Effekte sein. Weitere Untersuchungen zu dieser Frage waren wegen des hohen Preises für den Cofaktor nicht möglich.

#### *Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch Colipase bei höheren Temperaturen*

Die beschriebene nichtlineare Substrathydrolyse bei Temperaturen über  $28^\circ\text{C}$  ist durch den Zusatz von Colipase beeinflussbar. Bei kleinen Serumvolumina im Test wird die Kinetik wesentlich verbessert, wenngleich kein völlig linearer Substratsatz erreicht wird (Abb. 8a). In den meisten untersuchten hochaktiven Proben werden in Gegenwart des Cofaktors anfänglich katalytische Aktivitäten gefunden, die in dem theoretisch zu erwartenden Bereich (Auftragung nach *Arrhenius* (9)) liegen. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse, die an einem hochaktiven Serum ( $100\ \mu\text{l}/\text{Test}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  gewonnen wurden, in Abhängigkeit von der Colipasekonzentration dargestellt. Es wurde jeweils ein Ansatz über einen längeren Zeitraum titriert, vom zeitlichen Ablauf her sind die senkrechten Spalten vergleichbar. Es ist auffällig, daß die beobachtete Linearisierung keine direkte Abhängigkeit von der eingesetzten Colipasekonzentration zeigt und daß die Zugabe größerer Mengen des Proteins nicht zu einer völlig geradlinigen Kine-

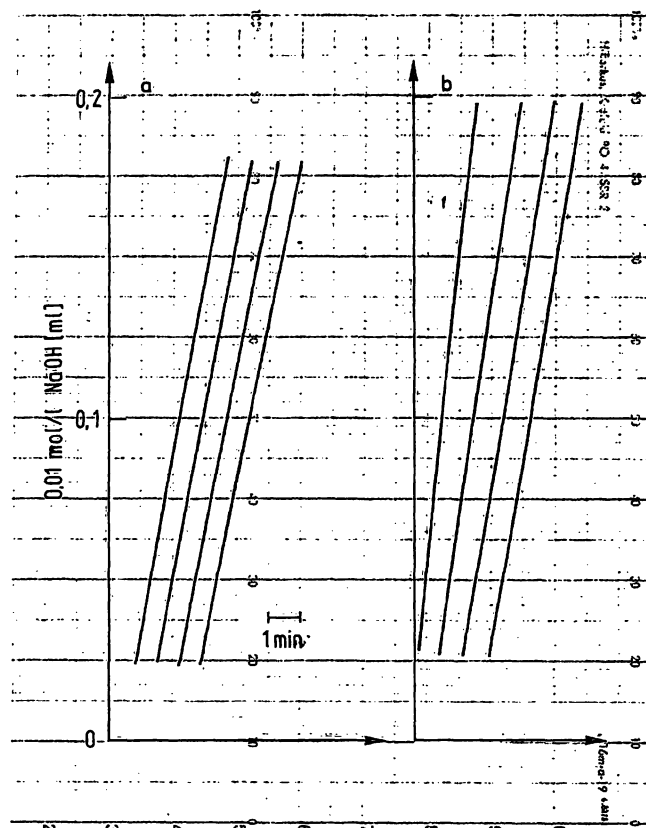


Abb. 8. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.

Einfluß des Serumvolumens auf den Reaktionsablauf bei  $37^\circ\text{C}$  in Gegenwart von Colipase.

a)  $50\ \mu\text{l}$  Serum Ba. (Sollwert  $11600\ \text{U/l}$ ) und  $333\ \mu\text{g}$  Colipase/l im Test.

Ermittelte katalytische Aktivitäten:  $10840, 10400, 10100, 9750\ \text{U/l}$ .

b)  $1,0\ \text{ml}$  Serum H. (Sollwert  $1200\ \text{U/l}$ ) und  $3,33\ \text{mg}$  Colipase/l im Test.

Bei Auswertung des anfänglich registrierten Laugeverbrauchs ermittelte katalytische Aktivitäten:  $987, 675, 600, 585\ \text{U/l}$ .

Triglyceridgemisch s. Reagens 3.

Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.

Es wurde jeweils ein Testansatz über einen längeren Zeitraum titriert.

tik führt, wie sie ohne Colipase an dieser Probe zwischen  $20$  und  $30^\circ\text{C}$  vorlag.

Setzt man dagegen höhere Volumina (z.B.  $1,0\ \text{ml}$ ) einer Probe mit mäßig erhöhter katalytischer Aktivität in den Test ein, so ist es nicht möglich, eine Colipasekonzentration zu ermitteln, bei der eine annähernd lineare Hydrolyse beobachtet wird und somit eine reproduzierbare Auswertung erfolgen kann. Bei sehr hohem Colipaseüberschuß kommt es wieder zur „Verschlechterung“ der Kinetik. Dies könnte auf der von *Borgström* (12) an reinen Proteinen beobachteten kompetitiven Hemmung der Lipase durch einen 1000fachen Überschuß an Colipase beruhen. Bei einer Reihe von Seren wird auch der theoretisch nach *Arrhenius* (9) zu erwartende Wert nicht erreicht. In Abbildung 8b ist ein Beispiel dargestellt, wobei Colipase in einem 1000fachen mola-

Tab. 2. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.  
Einfluß der Konzentration an Colipase im Test auf die Reaktionskinetik bei 37 °C.  
Triglyceridgemisch s. Reagens 4.  
Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.  
100 µl Serum Mi. (Sollwert 9100 U/l) im Test.  
Es wurde jeweils ein Testansatz über einen längeren Zeitraum titriert, die Auswertung erfolgte in vergleichbaren Zeitabständen.  
Die in Gegenwart hoher Colipasekonzentrationen ermittelten Leerwerte sind nicht berücksichtigt.  
Die z.T. erheblichen Abweichungen vom Sollwert beruhen auf der bereits vor Beginn der Auswertung stark unterschiedlichen Unlinearität des Reaktionsablaufs bei der Meßtemperatur von 37 °C.

Colipase (µg/l)	Ansatz	Lipase (U/l)
0	I	4750, 4130, 4030, 3680
	II	4850, 4440, 4130, 3880
0,33	I	5090, 4670, 4330, 4100
	II	4960, 4540, 4280, 3960
3,3	I	7000, 6750, 6550, 6320
	II	6500, 6380, 6130, 5810
33	I	9000, 8620, 8250, 8060
	II	8750, 8380, 8000, 7850
333	I	8950, 8400, 8130, 7830
	II	8750, 8450, 8130, 7750
667	I	8250, 8150, 7880, 7620
	II	8200, 8120, 7830, 7680
1670	I	8250, 7950, 7750, 7500
	II	8180, 7890, 7700, 7420
3330	I	8120, 7870, 7750, 7400
	II	8080, 7800, 7680, 7420

ren Überschuß vorhanden war. Geringere Konzentrationen an Cofaktor ergaben an dieser Probe keine bessere Linearität.

Das *Ausmaß* der nichtlinearen Substrathydrolyse bei höheren Temperaturen in Anwesenheit von Colipase ist neben dem verwendeten Serum und dem Probenvolumen auch vom eingesetzten Triglyceridgemisch abhängig.

*Borgström* (27) führt als Erklärung für die konstantere Substrathydrolyse bei hohen Meßtemperaturen in Gegenwart von Colipase an, daß der Cofaktor das Enzymprotein vor der temperaturbedingten Denaturierung an der Phasengrenzfläche schützt. Diese Hypothese wird durch folgende Beobachtung unterstützt: Setzt man bei 37 °C laufenden Ansätzen nachträglich Colipase zu, so wird nicht mehr dieselbe Annäherung an die theoretisch zu erwartenden Aktivitäten erzielt, als wenn der Cofaktor dem Testsystem von Anfang an zugefügt wird (Abb. 9). Daß nachträglich zu einem Ansatz zugefügte Colipase nicht den gleichen Effekt hat, entspricht auch den Erfahrungen mit nachträglich zugesetzten Gallensalzen (6, 13).

Eine vollständige Linearisierung der Substrathydrolyse in Gegenwart von Colipase war auch durch Variation der Meßbedingungen nicht möglich. Werden Probe und Colipase gemischt und unterschiedlich lange bei 37 °C vorinkubiert, so zeigt sich nach Zugabe des Gemisches zu Gallensalz-haltigem Substrat keine konstantere Hydrolysegeschwindigkeit. Eine Vorinkubation von Serum, Colipase und Na-Glykocholat ist deshalb nicht möglich, weil der Zusatz des Gallensalzes in der Menge, die im Testansatz einer optimalen Konzentration entspricht, in Abhängigkeit von der vorhandenen Serummenge eine mehr oder weniger ausgeprägte Verminderung der Lipaseaktivität bewirkt. Während bei Verwendung von 1,0 ml Serum praktisch keine Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit gefunden wurde, zeigten 50 µl einer Probe mit hoher katalytischer Aktivität (13000 U/l) unter den beschriebenen Bedingungen bei 37 °C eine rasche Inaktivierung; in einem halb-logarithmischen Maßstab ergab sich bei Auswertung des jeweils anfänglich registrierten Laugeverbrauchs in einem Zeitraum von 60 Minuten ein geradliniger Abfall, aus dem sich eine Halbwertszeit von 25 Minuten ermitteln ließ.

Ebenso wie bei niedrigen Meßtemperaturen ist auch bei 37 °C durch den Einsatz höherer Na-Glykocholatkonzentrationen keine befriedigende Änderung der Reaktionskinetik zu erzielen.

Substratverdünnungen in bidest. Wasser führten bei einer Meßtemperatur von 37 °C auch in Anwesenheit von Colipase nicht zu einem geradlinigen Zusammenhang zwischen  $v$  und  $\frac{v}{[S]}$ . Wurde Gummi arabicum als Verdünnungsmedium benutzt, so zeigte sich bei Auswertung des anfänglichen Laugeverbrauchs ebenso wie in Abwesenheit des Cofaktors keine veränderte Substrataffinität im Vergleich zu einer Temperatur von 25 °C. In allen Verdünnungen bewirkte die Anwesenheit von Colipase bei 37 °C im Vergleich zu Cofaktor-freien Ansätzen eine bessere Kinetik.

Zusammenfassend ist an einer Probe (1,0 ml Serum im Test) das beschriebene Verhalten in der Auftragung nach *Arrhenius* (9) im Vergleich zu Cofaktor-freien Ansätzen bei den verschiedenen Meßtemperaturen aufgezeigt (Abb. 10). Hier wurde – analog zu Tabelle 2 – jeweils ein Ansatz über eine geraume Zeit registriert und in Abständen ausgewertet. Der Übersicht halber sind Mehrfachwerte nicht eingetragen. Auch aus dieser Darstellung ist zu ersehen, daß die Colipase-haltigen Ansätze eine inkonstante Hydrolysegeschwindigkeit zeigen und daß (bei 37 °C dargestellt) die Verwendung hoher Konzentrationen des Cofaktors keine Verbesserung bewirkt.

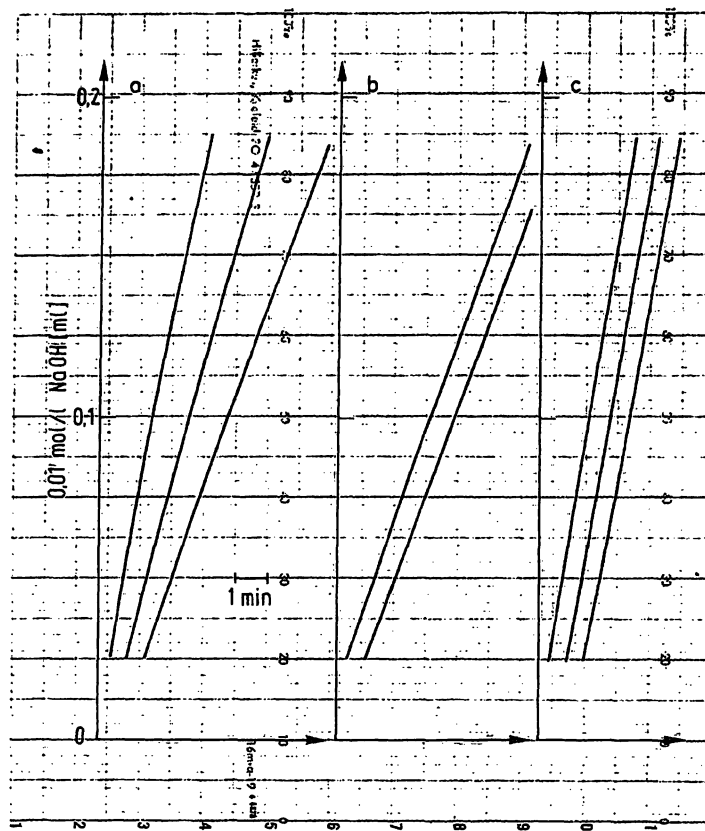


Abb. 9. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.

Abhängigkeit des Einflusses von Colipase auf den Reaktionsablauf bei 37 °C vom Zeitpunkt der Zugabe zum Testansatz.

a) ohne Zusatz von Colipase

Bei Auswertung des anfänglich registrierten Laugeverbrauchs ermittelte katalytische Aktivitäten: 11750, 7650, 5780 U/l.

b) nachträglich Zusatz von Colipase (Endkonzentration 666 µg/l) in den bereits registrierten Testansatz (s. Kurve a)

Ermittelte katalytische Aktivitäten: 5720, 5480 U/l.

c) Zusatz von Colipase (Endkonzentration 666 µg/l) in einen Testansatz vor Beginn der Titration.

Ermittelte katalytische Aktivitäten: 12250, 11600, 11100 U/l.

Triglyceridgemisch s. Reagens 3.

Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.

50 µl Serum Ba. (Sollwert 11600 U/l) im Test.

Es wurde jeweils ein Testansatz über einen längeren Zeitraum titriert.

### Ergebnisse in Abhängigkeit vom verwendeten Triglyceridgemisch

Auf die Unterschiede der beschriebenen Effekte in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat kann in diesem Rahmen nicht detailliert eingegangen werden. Lediglich 3 Befunde sind hervorzuheben. Die erwähnte Serum-abhängige Unlinearität bei hohen Meßtemperaturen war bei Verwendung des unter Reagens 4 genannten Öls am stärksten ausgeprägt und bei Reagens 3 am wenigsten deutlich. Das synthetische Triolein von hoher Reinheit (Reagens 5) zeigte bei Einsatz geringer Probevolumina auch bei 25 °C eine unlineare Substrathydrolyse, die jedoch durch Zusatz von inaktiviertem Sammelserum zu beseitigen war. Das Gallensäureoptimum variierte bei den verschiedenen Ölen geringfügig, es lag zwischen 0,75–1,25 mmol/l Na-Glykocholat.

In zahlreichen Publikationen (z.B. 7, 27, 28, 29) werden nichtlineare Substratumsätze bei Meßtemperaturen von 25 °C oder darunter beschrieben. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß das Ziel solcher Untersuchungen meist nicht die Ausarbeitung optimaler Testbedingungen ist. Als Ursache für derartige Reaktionsverläufe sind der Dispersionsgrad des Substrats, eine nicht optimale Konzentration von Gallensalzen, Calciumionen oder Natriumchlorid sowie der geringe Proteingehalt der verwendeten Lipasepräparationen zu diskutieren. Es sei auch erwähnt, daß zahlreiche der im Handel erhältlichen Olivenöl- oder Trioleinpräparate nicht die Anforderungen eines linearen Substratumsatzes gewährleisten (30).

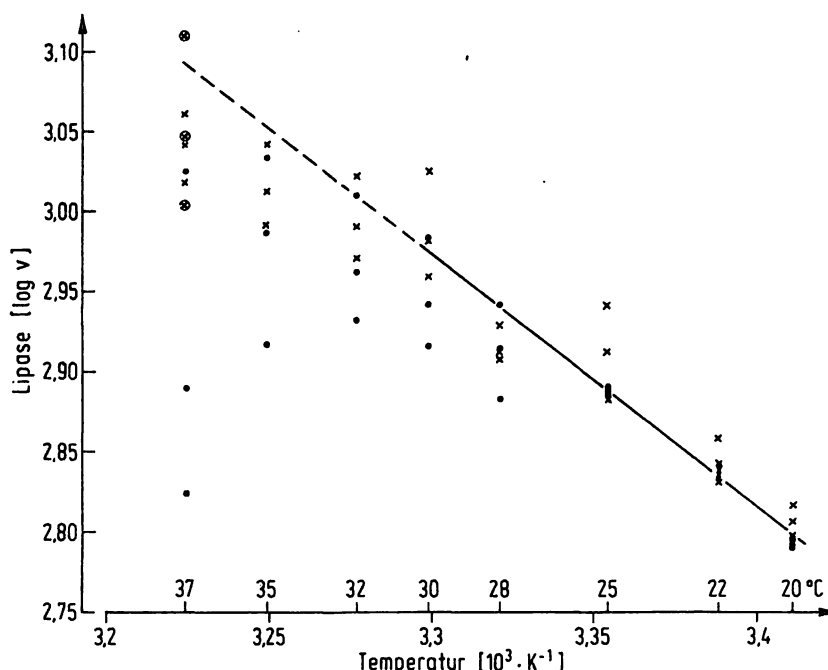


Abb. 10. Kontinuierlicher titrimetrischer Test.

Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur, Auswertung nach Arrhenius (9).

$Q_{10}$ -Wert (ohne Colipase) = 1,50

Triglyceridgemisch s. Reagens 3.

Optimale Na-Glykocholatkonzentration im Test.

1,0 ml Serum M. im Test.

Es wurde jeweils ein Testansatz über einen längeren Zeitraum titriert.

○ ohne Colipase

x 333 µg/l Colipase im Test

⊙ 3,33 mg/l Colipase im Test

## Schlußbetrachtung

Borgström et al. (15) haben die außerordentlichen Schwierigkeiten, das komplizierte Zusammenspiel in vivo zwischen Pankreaslipase, Cofaktor, Substrat, Gallensäuren, Gallenlipiden, Nahrungsproteinen, Phospholipase A<sub>2</sub>, Pharynxlipase, Fettsäuren, Calcium, Wasserstoffionen u.a. zu verstehen, eindrucksvoll dargestellt. Auch die zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Lipase verwendeten kontinuierlichen Titrationsverfahren stellen ein äußerst kompliziertes System dar, in dem das benutzte Substrat, seine Aufbereitung, der Emulgator und dessen Konzentration, die Art und das Volumen der Probe (20–1000 µl Serum), der Cofaktor (Spezies, Molekülgröße), Calciumionen, Gallensalze (Art und Konzentration), der pH-Wert und die Temperatur eine Rolle spielen. Über die Wechselwirkungen dieser einzelnen Komponenten in vitro gibt es bisher nur Hypothesen (31–37). Auch für die in Abhängigkeit vom verwendeten Serum und Triglyceridgemisch bei Temperaturen von 28 °C oder mehr beobachteten nichtlinearen Reaktionsabläufe kann eine Inaktivierung der Lipase an der Grenzfläche der Fetttröpfchen nur diskutiert werden, experimentelle

Beweise hierfür liegen nicht vor. Andererseits gelang es nicht, die Unlinearität durch Variation der Testbedingungen zu beheben. Wegen der komplizierten Abhängigkeiten ist es auch nicht möglich, für bestimmte Proben und Probenvolumina eine Temperaturgrenze anzugeben, bis zu der ein geradliniger Reaktionsablauf gewährleistet ist.

Aufgrund der vorgelegten Befunde kann als Meßtemperatur nur 25 °C empfohlen werden. Schon bei 30 °C sind einige Seren auch bei Reduktion des eingesetzten Volumens auf 0,5 ml – mit entsprechender Verminderung der Empfindlichkeit des Verfahrens – bei Verwendung bestimmter Triglyceridpräparationen nicht mehr reproduzierbar zu analysieren (Tab. 1).

Auch bei der Messung der katalytischen Aktivität anderer im Serum nachweisbarer Enzyme ist mit steigender Temperatur ein zunehmend unlinearer Substratumsatz zu beobachten (38). Szasz (10) wies bereits 1974 auf die Abweichung von den theoretisch nach Arrhenius (9) zu erwartenden Werten bei zahlreichen klinisch bedeutsamen Fermenten hin.

Bergmeyer (39) und E. Schmidt (40) haben daher die wesentlichen Argumente sowohl aus dem Bereich der Grundlagenforschung als auch der Meßtechnik, die für eine Analyse aller Enzyme bei 25 °C sprechen, überzeugend zusammengestellt.

1982 (13) machten wir den Zusatz von Colipase, die zwar keine Aktivitätssteigerung in dem verwendeten

Testsystem bewirkt (s. auch l.c. (12)), es jedoch ermöglicht, eine Hemmwirkung zu hoher Gallensalzkonzentrationen aufzuheben, davon abhängig, ob Colipase in ausreichend reproduzierbarer und definierter Form im Handel vorliegt. Die an 4 Chargen des zur Zeit kommerziell erhältlichen Cofaktors gemachten und beschriebenen Erfahrungen sprechen nicht für den Zusatz von Colipase.

## Literatur

1. Nealon, D. A. (1983) persönliche Mitteilung.
2. Reinigung von Triglyceriden mit Aluminiumoxid, modifiziert nach Tietz, N. W. & Fiereck, E. A. (1966) Clin. Chim. Acta 13, 352–358.
3. Grubhofer, N. (1983) persönliche Mitteilungen.
4. Rick, W. & Hockeborn, M. (1983) unveröffentlichte Ergebnisse.
5. Rick, W. (1969) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7, 530–539.
6. Tietz, N. W. & Repique, E. V. (1973) Clin. Chem. 19, 1268–1275.
7. Granon, S. & Sémériva, M. (1980) Eur. J. Biochem. 111, 117–124.
8. Fritz, P. J. & Melius, P. (1963) Can. J. Biochem. 41, 719–730.
9. Arrhenius, S. (1889) Z. Physikal. Chem. 4, 226–248.
10. Szasz, G. (1974) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 166–170.
11. Hofstee, B. H. J. (1952) Science 116, 329–331.
12. Borgström, B. (1982) Biochim. Biophys. Acta 712, 490–497.
13. Hockeborn, M. & Rick, W. (1982) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 773–785.
14. Brockerhoff, H. & Jensen, R. G. (1974) Lipolytic enzymes. Academic Press, New York pp. 82–83.
15. Borgström, B., Erlanson-Albertsson, C. & Wieloch, T. (1979) J. Lipid Res. 20, 805–816.
16. Lumper, L. (1964) Grundlagen der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen. In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse (Lang, K. & Lehnartz, E., eds.). Springer, Berlin. pp. 17–55.
17. Sarda, L. & Desnuelle, P. (1961) unveröffentlichte Ergebnisse, zit. nach: Desnuelle, P. (1961) Pancreatic lipase. Adv. Enzymol. 23, 129–161.
18. Sizer, I. W. & Josephson, E. S. (1942) Food Research 7, 201–209.
19. Bergmeyer, H. U. (1977) Bestimmung der katalytischen Aktivität von Enzymen. In: Grundlagen der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.). Verlag Chemie, Weinheim pp. 58–81.
20. Maylié, M. F., Charles, M., Gache, C. & Desnuelle, P. (1971) Biochim. Biophys. Acta 229, 286–289.
21. Erlanson, C., Fernlund, P. & Borgström, B. (1973) Biochim. Biophys. Acta 310, 437–445.
22. Canioni, P., Julien, R., Rathelot, J., Rochat, H. & Sarda, L. (1977) Biochimie 59, 919–925.
23. Da Fonseca-Wollheim, F. (1973) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 421–426.
24. Hummel, B. C. W. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1393–1399.
25. Erlanson-Albertsson, C. & Larsson, A. (1981) Biochim. Biophys. Acta 665, 250–255.
26. Lairon, D., Nalbone, G., Lafont, H., Domingo, N. & Hauton, J. C. (1978) Lipids 13, 211–216.
27. Borgström, B. & Erlanson, C. (1973) Eur. J. Biochem. 37, 60–68.
28. Patton, J. S. & Carey, M. C. (1981) Am. J. Physiol. 241, G328–G336.
29. Rigler, M. W. & Patton, J. S. (1983) Biochim. Biophys. Acta 751, 444–454.
30. Rick, W. & Hockeborn, M. (1983) unveröffentlichte Ergebnisse.
31. Desnuelle, P. (1961) Adv. Enzymol. 23, 129–161.
32. Borgström, B. (1974) Fat digestion and absorption. In: Biomembranes (Manson, M. D., ed.) Vol. 4B, Plenum Publ., New York, pp. 555–620.
33. Verger, R. & Haas, G. H. de (1976) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 5, 77–117.
34. Sémériva, M. & Desnuelle, P. (1979) Adv. Enzymol. 48, 319–370.
35. Verger, R. (1980) Methods Enzymol. 64, 340–392.
36. Leger, C. & Charles, M. (1980) Wld. Rev. Nutr. Diet. 35, 96–128.
37. Lairon, D., Nalbone, G., Domingo, N., Lafont, H., Hauton, J., Julien, R., Rathelot, J., Canioni, P. & Sarda, L. (1975) Lipids 10, 262–265.
38. Rick, W. (1983) unveröffentlichte Ergebnisse.
39. Bergmeyer, H. U. (1973) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 39–45.
40. Schmidt, E. (1983) Mitt. Dt. Ges. Klin. Chem. 14, 26–29.

Prof. Dr. W. Rick  
Institut für Klinische Chemie  
und Laboratoriumsdiagnostik  
der Universität Düsseldorf  
Moorenstraße 5  
D-4000 Düsseldorf 1